

REZUMAT

Utilizarea substanțelor medicamentoase, atât în scop profilactic, curativ, dar și pentru creșterea randamentului productivității, conduce la îmbunătățirea sănătății animalelor, la reducerea valorilor indicatorilor de impact asociați bolilor infecțioase bacteriene dar favorizează dezvoltarea și răspândirea rezistenței la antibiotice.

Una dintre consecințele administrării necontrolate a antibioticelor constă în modificarea populațiilor bacteriene prin selecția continuă a clonelor bacteriene rezistente, indiferent dacă sunt patogene sau comensale.

Creșterea rezistenței bacteriilor zoonotice la antibiotice a devenit o problemă importantă de sănătate publică la nivel global. Riscul ineficienței tratamentului face ca bacteriile zoonotice rezistente la antimicrobiene să constituie în prezent un subiect de real interes atât în medicina umană, cât și în cea veterinară. Abordarea holistică a conceptului „One Health” include evaluarea posibilelor legături dintre animale, oameni și mediu. Transmiterea bacteriilor rezistente la oamenii care trăiesc în fermă sau în vecinătatea acestora, precum și transmiterea la consumatorii produselor de origine animală, este dovedită științific prin identificarea genelor de rezistență la tulpini izolate atât de la oameni cât și la animale.

Printre procesele de adaptare continuă a bacteriilor se numără și creșterea rezistenței la antimicrobiene, ca urmare a administrării, în unele cazuri excesiv, a acestor medicamente. Apariția *Enterobacteriaceaelor* producătoare de ESBL în microflora fecală a animalelor de fermă reprezintă un risc evident de contaminare a produselor alimentare, ce pot fi vectori majori pentru transportul ESBL în populația umană.

Depistarea și caracterizarea continuă a tulpinilor de *E. coli* producătoare de ESBL este necesară, sub aspectul impactului porcinelor sănătoase, ca posibil rezervor de *Enterobacteriaceae*, asupra lanțului alimentar. În prezent, la *Enterobacteriaceae*, unul dintre cele mai importante mecanisme de rezistență, care reduce chiar și eficacitatea cefalosporinelor moderne cu spectru extins, se bazează pe producerea de enzime, mediată de plasmide, care inactivează acești compuși prin hidrolizarea inelului lor beta-lactamic.

Prezentul studiu demonstrează o frecvență crescută a tulpinilor de *E. coli* sintetizatoare ESBL în fermele de porcine cu consum ridicat de cefalosporine din a treia sau a patra generație și indică transferul mediat plasmidic, între porci și fermieri.

Confirmarea transferului interspecific se poate face pe baza identificării genei CTX-M-1 la izolatele de la animale și om.

Teza de doctorat cu titlul „**Investigații privind rezistența la antibiotice și riscul zoonotic asociat tulpinilor de *Escherichia coli* izolate de la porc**” este structurată, conform uzanțelor, în două părți și cuprinde un număr de 142 pagini.

Prima parte, care conține „**Stadiul actual al cunoașterii**”, cuprinde 22 de pagini, fiind structurată în trei capitole. Pe parcursul acestei părți sunt prezentate sintetic date

bibliografice necesare înțelegerii temei propuse. Sunt descrise date privind: epidemiologia și caracteristicile speciei *E. coli*, fenomenul de antibioretistență prin mecanismul enzimelor beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL) la *E. coli* și identificarea fenotipică și caracterizarea moleculară a tulpinilor de *E. coli* producătoare de ESBL.

Partea a doua a tezei se întinde pe 92 de pagini, ce cuprind 42 imagini/ 21 tabele, 249 de titluri bibliografice și este structurată în cinci capitole.

Capitolul 4, descrie în mod succint cadrul organizatoric și instituțional în care s-au desfășurat cercetările.

Capitolul 5, cuprinde „*Scopul și obiectivele tezei*”, care și-a propus de a investiga și caracteriza tulpinile de *E. coli* sintetizatoare de beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL) izolate de la porci și îngrijitorii din ferme, ce au utilizat sau nu anterior cefalosporine.

Prezentul studiu evaluează situația actuală privind portajul și potențialul zoonotic al tulpinilor de *E. coli* sintetizatoare de ESBL, analiza modelului de rezistență la antibiotice non-beta-lactamice pentru unele tulpini de *E. coli* sintetizatoare ESBL pozitive izolate și stabilirea gradului de înrudire genetică a tulpinilor de enterobacterii ESBL izolate de la porcii abatorizați cu cele izolate de la personalul care lucrează în fermele de unde au provenit suinele sacrificate.

Obiectivele propuse pentru atingerea scopului au fost:

- recoltarea probelor de conținut cecal de la porcii abatorizați și de la personalul din ferme;
- prelucrarea microbiologică a probelor prin: preîmbogățirea neselectivă, izolarea selectivă a tulpinilor de *E. coli* prezumtiv ESBL/AmpC (screening-ul ESBL/AmpC), încadrarea taxonomică a tulpinilor izolate în urma screening-ului ESBL și confirmarea fenotipică ca fiind producătoare de ESBL/AmpC a tulpinilor de *E. coli* identificate;
- caracterizarea rezistenței la antibioticele non-beta-lactamice pentru izolatele de *E. coli* prezumtiv producătoare ESBL/AmpC;
- caracterizarea moleculară a tulpinilor de *E. coli* izolate în urma detecției ESBL, în vederea identificării principalelor gene ce codifică enzimele beta-lactamază cu spectru extins;
- încadrarea tulpinilor de *E. coli* în grupurile filogenetice;
- amplificarea și secvențierea genelor implicate în sinteza acestor enzime;
- detecția tipurilor de plasmide pe care se găsesc genele responsabile de codificarea enzimelor ESBL.

Capitolul 6, intitulat „*Detecția tulpinilor de E. coli producătoare de ESBL izolate de la porcine și om*”, descrie etapa de izolare și identificare a tulpinilor producătoare de ESBL/AmpC și confirmarea fenotipică a acestora.

Pe durata a trei ani consecutivi: 2016, 2017 și 2018, au fost examinate 200 de probe de conținut cecal recoltat de la suinele abatorizate și 32 probe coprologice recoltate de la personal medical și îngrijitori de suine. În urma detecției ESBL, din totalul de 232 de probe au fost izolate 123 (53.02%) de tulpini de *E. coli* prezumtiv ESBL, dintre care 118/200 de origine animală și 5/32 de origine umană.

Toate izolatele bacteriene (de origine umană și animală) dezvoltate pe mediul specific agar MacConkey suplimentat cu cefotaxim (MC+CTX), au fost confirmate fenotipic ca fiind ESBL/AmpC.

După analiza rezultatelor obținute pe probele de origine animală, în funcție de județul de origine al probelor, procentul de tulpini *E. coli* prezumtiv producătoare de ESBL este cuprins în intervalul 51-70, după cum urmează: pentru Botoșani, 51.72% (45/87), pentru Suceava, 55.56% (25/45) iar pentru Iași - 70.59% (48/68). Pentru probele de origine umană, 2 izolate de *E. coli* sintetizatoare ESBL/AmpC au fost din județul Iași și 3 din Botoșani.

Pentru confirmarea fenotipică a tulpinilor de *E. coli* sintetizatoare de beta-lactamaze cu spectru extins s-a folosit metoda microdiluției în bulion. În urma realizării testelor de sinergie, dintre acid clavulanic și ceftazidim și/sau a acidului clavulanic și cefotaxim s-au obținut următoarele fenotipuri: ESBL 77/118 (65.25%), ESBL+AmpC 5/118 (4.23%) și AmpC 36/118 (30.50%). Pentru cele 5 izolate de origine umană obținute, fenotipul majoritar identificat a fost ESBL 3/5 (60%), urmat de fenotipul ESBL+AmpC 1/5 (20%) și AmpC 1/5 (20%).

În urma testării prin metoda microdiluției în bulion, pentru tulpinile confirmate fenotipic ca producătoare de ESBL/AmpC, s-a stabilit și gradul de rezistență/sensibilitate la alte clase de antibiotice, după cum urmează: beta-lactamine (100% rezistență la ampicilină), sulfonamide (rezistență la sulfamethoxazol 96/118 (81.36%) și 76/118 (64.41%) la trimethoprim. Cele 5 tulpini de origine umană au prezentat rezistență la sulfamethoxazole -3/5 (60%) și la trimethoprim -2/5 (40%).

În ce privește categoria fluoroquinolonelor, raportarea arată că nivelul de rezistență la ciprofloxacin și acid nalidixic a fost peste 50%, astfel că din numărul total de tulpini de origine animală testate, 66/118 (55.93%) au fost rezistente la ciprofloxacin, iar 74/118 (62.71%) la acidul nalidixic (NAL). Dintre izolatele de origine umană, atât pentru ciprofloxacin cât și pentru acidul nalidixic, s-au înregistrat 3/5 (60%) tulpini rezistente.

Capitolul 7, denumit „*Caracterizarea substratului molecular al tulpinilor de E. coli ESBL pozitive izolate de la porci abatorizați și de la personal din ferme*”, cuprinde analiza moleculară efectuată urmărind principalele gene ce codifică enzimele ESBL/AmpC.

În acest capitol au fost caracterizate molecular tulpinile de *E. coli* ESBL/AmpC prin identificarea principalelor gene ce codifică enzimele ESBL/AmpC, s-a realizat identificarea unor markeri genetici asociați cu rezistența mediată plasmidic la fluoroquinolone sau colistin și încadrarea izolatelor de *E. coli* în principalele grupuri filogenetice.

Dintre cele 5 grupuri principale de enzime ESBL de tipul CTX-M-U, s-a urmărit identificarea celor mai frecvente: CTX-M-1, TX-M-9, TEM, SHV, OXA. Din cele 118 tulpini testate molecular, la 72/118 (61 %) s-a identificat prezența genei *bla*_{CTX-M-U}. Dintre acestea, 44/72 (61.11%) au aparținut grupului CTX-M-1, 18/72 (25 %) grupului CTX-M-9, iar 10/72 (13.89%) tulpini de origine animală, cu semnal pozitiv pentru gena *bla*_{CTX-M-U}, nu au aparținut niciunuia dintre cele două grupuri menționate anterior.

Prezența genelor *bla_{SHV}* a fost identificată la 44/118 (37.28%) tulpini de origine animală, în timp ce *bla_{TEM}* doar la 2/118 tulpini (1.69%) dintre izolate, iar *bla_{OXA}* la o singură tulpină de origine animală 1/118 (1,40%).

Prevalența genelor *bla_{CTX-M}* pentru **izolatele umane** este de 80% (4/5). Pentru grupul de enzime CTX-M-1, 3/4 (75%) tulpini au fost pozitive, iar pentru grupul CTX-M-9 nu au fost identificate gene. De asemenea, ca și în cazul izolatelor de origine animală, o tulpină (25%) nu a aparținut niciunui din cele 2 grupuri de enzime analizate.

Identificarea genelor *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* și *bla_{OXA}* pentru tulpinile de origine umană au condus la identificarea genei *bla_{SHV}*, în proporție de 20% (1/5), iar genele *bla_{TEM}* și *bla_{OXA}* nu au fost identificate la nicio tulpină analizată.

Datorită faptului că prezența fenotipului AmpC maschează de cele mai multe ori fenotipul ESBL, prevalența tulpinilor AmpC pozitive a fost calculată consecutiv testării moleculare. În urma investigațiilor efectuate la nivel molecular, având ca țintă gena *bla_{CTX-M}*, pentru 35/118 (29.66 %) izolate de origine animală și 1/5 (20%) de origine umană au fost obținute rezultate pozitive.

Toate tulpinile au fost testate molecular pentru genele *bla_{qnrA}*, *bla_{qnrB}* și *bla_{qnrS}*, ce codifică rezistența la fluoroquinolone și *mcr-1* și *mcr-2*, care codifică rezistența mediată plasmidic la colistin.

Numărul total de tulpini de origine animală rezistente la fluorochinolone a fost de 22/118, dintre care 1/118 (0.85 %) pozitivă pentru gena *bla_{qnrA}*, 3/118 (2,54 %) pozitive pentru gena *bla_{qnrB}* și 18/118 (15.25 %) pozitive pentru gena *bla_{qnrS}*. Spre deosebire de tulpinile de origine animală analizate, în cazul izolatelor umane nu a fost pusă în evidență nicio tulpină pozitivă pentru genele *bla_{qnrA}*, *bla_{qnrB}*, *bla_{qnrS}*.

În ceea ce privește rezistența la colistin, s-a observat că 3/118 (2.54%) tulpini de *E. coli* de origine animală sunt rezistente la colistin, pe baza identificării genei *mcr-1*. La nici o tulpină nu a fost semnalată prezența genei *mcr-2*, iar pentru izolatele de origine umană nu a fost identificată niciuna din cele două gene.

Mai mult, tulpinile pozitive pentru gena *mcr-1* au fost analizate din punct de vedere molecular și pentru prezența genelor ce codifică grupul CTX-M-1, gene SHV și *qnrS*, ceea ce înseamnă că aceste izolate sunt rezistente nu doar la colistin ci și la antibiotice beta-lactamine, inclusiv la cefalosporine de generația a treia și fluoroquinolone.

Lotul nostru de tulpini de *E. coli* ESBL (118 de la suine și 5 de la personalul din fermă) au fost analizate filogenetic. Analiza filogenică a arătat că toate tulpinile de *E. coli* se încadrează în cele 4 grupuri principale: A, B1, B2 și D, conform combinației a trei markeri genetici.

Tulpinile de *E. coli* sintetizatoare ESBL de proveniență animală au fost **atribuite în principal grupului filogenetic A, 37/118 (31.24%), filogrupului B1, 25/118 (21.18 %)**, urmate de 23/118 (19.49%) filogrup D și 20/118 (16.94%) filogrup B2. Alte 13/118 (11.15%) nu au putut fi încadrate.

Analizând izolatele de la suine, proporția de 52,42% a tulpinilor comensale (A, B1) este mai mare decât proporția tulpinilor extraintestinale, 36.43% (B2, D). În conclu-

zie, cele două tipuri de tulpini evoluează concomitent în cadrul fermelor de unde au fost abatorizate suinele luate în acest studiu.

Din cele 5 tulpini de origine umană analizate, filogrupurile detectate au fost A și B2, în procente egale de 40%, filogrupurile B1 și D nu au fost identificate iar una (20%) nu a aparținut niciunui filogrup.

Capitolul 8 detaliază „*Analiza filogenetică a genelor ce codifică enzimele ESBL identificate la tulpinile de E. coli*”. Pentru realizarea acestui obiectiv, am selectat 21 de tulpini de *E. coli* caracterizate molecular din perspectiva genelor ce codifică enzimele CTX-M, 17 de origine animală și 4 de origine umană. Secvențierea s-a realizat prin tehnica Sanger, externalizată către laboratorul MacroGen Europa.

În urma analize secvențelor obținute, s-a observat că 11/17 (64.7%) din tulpini sunt purtătoare ale genei *bla*_{CTX-M-1}, restul tulpinilor prezentând genele *bla*_{CTX-M-15} (1/17), *bla*_{CTX-M-3} (1/17), *bla*_{CTX-M-8} (1/17) și *bla*_{CTX-M-9} (1/17). Pentru 2 tulpini nu am obținut rezultate în urma secvențierii. Pentru izolatele de origine umană, la toate cele 4 tulpini secvențiate s-a identificat gena *bla*_{CTX-M-1}.

Gena *bla*_{CTX-M-1} a fost cea mai predominantă în determinarea rezistenței mediată plasmidic la cefalosporine de generația a 3-a la izolatele de *E. coli* de la porcii abatorizați și în izolatele de *E. coli* de origine umană.

Gena *bla*_{CTX-M-8}, care este în general raportată rar, a fost identificată în lotul nostru de tulpini de la porcii abatorizați, aceasta fiind prima raportare în regiunea de Nord-Est a României.

În **capitolul 9**, sunt redată un număr de 18 concluzii finale.